PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number:

06-040938

(43)Date of publication of application: 15.02.1994

(51)Int.CI.

A61K 37/24 A61K 31/725

(21)Application number : **04-213438**

(71)Applicant: NAKAMURA TOSHIICHI

SUGIYAMA YUICHI

SUMITOMO PHARMACEUT CO LTD

(22)Date of filing:

17.07.1992

(72)Inventor: NAKAMURA TOSHIICHI

SUGIYAMA YUICHI

HANANO MANABU

(54) HGF-CONTAINING PHARMACEUTICAL PREPARATION

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a medicinal pharmaceutical preparation capable of carrying out prolongation of acting time of HGF(hepatocyte growth factor).

CONSTITUTION: The pharmaceutical preparation contains HGF and heparin. Since the HGF-containing pharmaceutical preparation which is effective and long acting at low dosage can reduce administration frequency and amount, relief from patient's pain and reduction of medical expenses can be carried out.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

09.07.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

11 特許田願公開番号

特開平6-40938

48 公開日 平成り年 1994 19月1日

Fr inti€...

識別記号 - 作内整理番号 - FI

技術表示簡單

AFOR 87 14

ACS

8804-40

5. -0.

8314-46

審査請求 未請求 請求項の数4 (全8頁)

(21)出願番号 特願平4-213438

(22) 出願日 平成4年(1992-7月17日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成4年3月5日 日本薬学会第112年会組織委員会発行の「日本薬学会第1 12年会講演要旨集』に発表

Uい出願人 59:115073

中村一數一

大阪府高槻市高見台10-27

(71)出願人 592173607

杉山 雄一

東京都武蔵野市西久保3丁目4番10号

(71) 出願人 000183370

住友製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

(72)発明者 中村 敏一

福岡市東区みどりケ丘3丁目11番6号

(74)代理人 弁理士 廣瀬 孝美

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】HGF含有製剤

.____

(FT) 【要約】

【目的】 HGF (肝細胞増殖因子) の作用時間の持続 性を図ることができる医薬製剤を提供することを目的と

【構成】 本発明の医薬製剤は、HGFとヘバリンとを 含有することからなる。本発明によれば、低用量で有効 な持続性のあるHGF含有医薬品が得られ、投与回数及 ひ投与量を低減できるので、患者の苦痛の緩和、医療費 の低減などを図ることができる。

【特許請求の範囲】

| Hのちられい|| 3 を含有すること 【請決項二】 を特面とする迅東製剤。

【請求項し】 | H3F担にヒトスは動物の組織図 は血液成分由来である請求項1記載心匠薬製剤。

- 日、F切、遺伝子組換により製造 【請才達主】 したものできる請求項1記載の医薬製剤。

「使甲時にHGFとイ、ヤリンとを混 合して調製される請求項1から4のいずれかに記載の医 薬製剤,

【発助に詳細な説明】

[((0)]

【産業上の利用分野】本発明は、HGF Hepatocyto (it ewin Factor、肝細胞増殖因子)を含有する医薬製剤に関 し、より詳細にはHGFの作用時間の持続性を図ること のできる医薬製剤に関するものである。

100021

【従来の技術】HGFは、中村らにより発見された、成 熱肝細胞に対して最も強力な増殖促進活性を持つ生理活 性ヘプチドであり(例えば、Biochem. Brophys. Res. C. 20 どから抽出、精製して得ることができる。また、HGF ommun 122, 1450, 1984, FEBS Letter, 22, 311, 198 「など参照」、近年生物工学的手法により量産が可能に なった「例えば、Nature、342, 440, 1989、Proc. Nat 1. Acad. Sci. USA, 87, 3200, 1990, Blochem. Biophy s. Rev. Commun., 172, 321, 1990など参照)。本因子 は、肝炎や肝硬変のみならず、腎炎や癌などに対する治 療・予防薬として、また制癌剤の副作用抑制剤や創傷治 糖剤などへの適用が期待されている。

100031

は图薬品としての利用が期待されている物質であるが、 本因子を単独で投与しても半減期数分で血中から消失す ることが、本因子を医薬品として開発していく上での大 きな障害となっていた。因に、本因子の血中よりのフリ アランスに関わる主要臓器は肝臓であることも既に知ら れている。本因子は高分子ヘブチドであり、例えば、注 財剤として患者に投与されることになるが、半減期の短 お薬剤はそのままでは頻回投与が持続投与を余儀なくさ れる。従って、患者は治療に当たって、持続性の長い薬 剤に比べてより大きな苦痛を強いられることになる。ま 40 クターに組み込んだ発現しマターによって動物細胞、例 た、血中ならのクリアランスが速ければ大量の薬剤投与 が必要となり、医療費の高騰を招束するとともに大量に 本因子を生産することが必要になる。一般的な製剤技術 てこの点を定服しようとする試みもあるが、本因子の特 性に対応して設計されたものではなく、行うな効果は得 うわていない。 ・食術は上記の課題を解決すべ「なさむ」 在东方河,加克路八百時間,日日五百月期間在空離投資 サたままで、血中が必じからできょうを低できせ、な医 子の作用技術時間を延長させることのできる製剤を提供。 することにある。

[00004]

【課題を解決するための手段】出記の課題を解決するた か、 本発明者とは日、引い作用時間を持続させることを 鋭意検討したところ、日母をの持つ4.1%、3 親和性の特 性を考慮してHGPとハヤルシとを併用すること、即ち HIPFとハイトリの複数体を形成させることにより、血 中よりに任う的にもりアランスを低でさせ得ることを見 出した。また、当試複合体の形成でHAFの持つ生物活 性い発現に支障を与えないことも確認した。本発明はか 10 がる知見に基づいてなされたものである。即ち、本発明 の振薬製剤は、HOPヒベバリンを含有することからな Ξ.

【10005】上記の構成からなる本発明の有効成分であ るHGFは、医薬として使用できる程度に精製されたも のであれば、種々の方法で調製されたものを用いること ができる。HGFの調製で法としては、各種の方法が知 られており、例えば、ラット、ウン、ウマ、ヒソシなど の哺乳動物の肝臓、脾臓、肺臓、骨髄、脳、腎臓、胎盤 等の臓器、血小板、白血球等の血液細胞や血漿、血清な を産生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養物 (培養上清、培養細胞など) からけ離精製してHGFを 得ることもできる。あるいは遺伝子工学的手法により日 GFをコードする遺伝子を適切なパクターに組込み、こ れを適当な宿主に挿入して刑質転換し、この刑質転換体 の培養物から目的とする組換えHSFを得ることができ る:例えば、Nature 342、440、1989など参照』。上記の 宿主細胞は特に限定されず、従来から遺伝子工学的手法 で用いられている各種の宿主細胞、例えば大腸菌、枯草 【発明が解決しようとする課題】上述のように、HGF 30 菌、酵母 糸状菌、植物又は動物細胞などを用いること ができる。

> 【0006】より具体的には。HSFを生体組織から抽 出精製する方法としては、例えば、ラットに四塩化炭素 を腹腔内投与し、肝炎状態にしたラットの肝臓を摘出し て粉砕し、S-セファロース、ヘベリルセファロースな どのゲルカラムクロマトグラフィー、HPLで等の通常 の蛋白質精製法にて精製することができる。また、遺伝 子組換え法を用い、ヒトHGFのアミ/酸配列をコード する遺伝子を、ウシュビローマウィルスDNAなどのベ えば、チャイニーガ (山下ヤー卵巣(C月())細胞、マ ウァミコ27細胞、サルくいら細胞などを形質転換し、 その培養上清より得ることができる。

【中607】かくして得られたHSFは、そのアミノ酸 配列の一部が欠失又は他ハアミ(酸により置換されてい た。」例のでは「敵魔人」、狐痺入さまでいた。 しょ - 文は、末端によりはとは、このに、「病も経済」 てったり、きるいは糖鎖が同様に欠失気は道袋をれてい でもよいっては、変狂(下流物物としては、使えば、特閲 31、重も一くとしても1号公報、国際公開W (も)に、1)にも

51号公報などに記載の物質が挙げられ、これらも本発 明に適用でき、す発明に範囲に含まれる。

は、医薬として使用できる程度に精製されたものであれ ばりずれらものも用いることができ、その由来に例え は、付き、づ々などがも特に限定されない。また、使用 されるべいりょう分子量も特に限定されず、高分子量へ、 ハヨン、低分子量ヘパリン及びそれらの混合物の一寸れ も使用することができる。HGFに対するベバリンの使 |用割合としては、HGF1gmolに対して、ペパリン=10 || られているタイプ1のHGFを使用したが、既にタイプ を0.01~50mg程度とされる。4/1.5.の使用量が0.01 加は未満では十分なHSFクリアランス低下効果を発現 てきないことがあり、また50mcを超えても問題はない がそれまでの量で効果を発揮できるので、その量を超え て加える必要性は少ない。

【0.0005】本発明の自的は、予め調製された日うF及 ひへれり」を含有する製剤を投与するが、又はHSFと ベベリンを含む製剤を用時に調製して投与することによ り達成される。適用症状としては、肝炎、肝硬変、腎 炎、瘍などの治療・予防、制癌剤の副作用抑制、創傷治 20 【0014】実施例2 癒の促進などが挙げられる。

【0010】4発明の製剤は種々の製剤形態(例えば、 液剤、問題剤 カフセル剤など)をとりするか、一般的 には有物成分であるHGF及びペペリンのみではそれら と慣用の担体と共に注射剤とされるか、又は慣用の担体 上共に外用薬とされる。当該注射剤は常法により調製す ることができ、例えば、HGF及びパパリンを適切な溶 剤(例えば、減菌水、緩衝液、生理食塩水等。に溶解し た後、コンスター等で濾過して威密し、次いで無菌的な 剤中のHCF含量としては、通常C0002~01(M/N)程 度、好ましては0.0()~0.1(M/V)) 程度に調整され、ヘバ リン含量はHGF含量に応じて適宜調整される。また、 外用薬としては、例えば、軟膏状、デル料、液状などの 剤形に製剤化され、製剤中のHGF含量は、外用薬の適 用疾患、適用部位などに応じて適宜調整することができ る。製剤化に際して、好ましくは安定化剤が添加され、 安定化剤としては、例えば、アルブミン、グロブリン、 セラチン、マンニトール、グルコード、デキストラン、 の製剤は製剤化に必要な添加物、例えば、賦形剤、溶解 補助剤、酸化防止剤、無痛化剤、等張化剤等を含んてい てもよう。初状製剤とした場合は連結保存、反は凍結乾 燥等によりか分を除去して保存するのが望ました。 凍結 乾燥製剤は、用時に注射用蒸留水などを加え、再溶解し 古使用される

【11117】本見時に製剤は、鉄製剤に形配に関いた選 自な投与網路により投与され得る。例えば、注射剤の形 態にして動脈、動脈、皮下、筋肉が等に投わすることが てきる。その物が量は、患者の症状、弁臓、体重なとに、症

より適宜調整されるが、通常日のFとして0.01歳~100元 ってあり、これを1日1回なり心数図にっけて粋りする こが確当てある。

[[[]]]

【実施例】以下、実施例及ご試験例に基づして本発明を 詳細に説明するが、本発明はこれのの例に限定されるも 「のではない」なお、以下に述べる実施例では中村らの総 説(何えば、(rithial Reviews in Uncogenerii, 3, 27 -54. 1991. 代謝 27. 599-606. 1991など参照には述べ 2及びタイプミのHGFもタイプ1のHGFと同等の括 性を有することが知られており、タイコン及びタイプ3 並びに各々イアの誘導体を用しても同様の効果が得られ ることは明られてある。

【0013】実施例1

生理食塩水100ml中にHGF1mg、ヘコリン4g、マシ エトール!g及びボリソリハート80 Homsを含む溶液を 無菌的に調製し、パイアル瓶に1回ずつ無菌的に分注 し、常法に準して凍結乾燥し、凍結乾燥製剤を得た。

0.35M N a C T と0 01%ポリフルペート80を含むpET.4の 0.02Mリン酸緩衝被100mlに、HGF1mg、ヘハリン4g 及びヒト血清アルブミン100mgを添加した水溶液を無菌 的に調製し、バイアル瓶に1回ずつ無菌的に分注し、常 法に準じて凍結乾燥し、凍結乾燥製剤を得た。

【0013】以下、試験例に基づいて、本発明を説明す る。なお、試験に用いたヘバリンは以下のとおりであ 3.

高分子量へバリン・シグマ製、製品番号 H 7005 [ナト 容器に充填することにより調製することができる。注射:30 リウム塩、グレード 日. フタ腸粘膜由来、分子量:2.5 ○00~35000(レーザー光散法)、18000~ 23000 (作り濾過法) [

> 低分子量ペパリン:シグマ社製、製品番号 E 5640 (土 トリウム塩、丁タ腸粘膜由来、豆子量・4000-60

【(, () 1 6】試驗例 1

ラート肝臓にHGFーベバラン複合体を灌流したときの 流出液中に出現した放射活性の割合及び肝抽出率

Ⅰで標識したトレーサー濃度 10. SpM)のHG エチレングリコールなどが挙げられる。さらに、本発明 40 Fのみ、及びこの標品とそれぞれり、1mg/ml、1 mg/ml、3mg/mlの高分子量にパリンをそれぞ れ混合した後、室温でも0分インキュニートして作成し た各複台体をデットに一回通過で灌流させた(灌流速 度、12ml/分)。灌流液は20% V/V/の年赤 血球、25°(W/V)の半血精でルマミン、BSA)。 それMでクロースで含むす物経療者では、 H.M. Nis 4 From Billi by MEE E m.M. M. g. S. . . -1 . Lin M - \mathbb{Z} a \mathbb{C} \mathbb{C} \mathbb{C} \mathbb{C} \mathbb{C} \mathbb{C} \mathbb{M} MES (手持て) 4 () を用いた (ぞを扱せて 5) たの ||八郎酸で丁のスペー||沈殿性の放射活性に対する肝静脈中 のTCA=沈殿性の放射活性の割合の時間推移。図1左 創し及びその肝抽出率。図1右側。を測定した。なれて 肝推出室は、心葉状態とで、一流入蔵中放射能・肝静脈 中放射能 一十元入院中放射能 より計算した。図りに 分されるように、1 mg - m. 1 次上のペペパンと記台し たとき、肝抽出率が顕著に低下した。また、HGEに血 中からのグリアランでに関わる主要臓器が肝臓であるこ とを御せ考えると、 エーマーマー条件でも、ペペルン により目の目の血中が見のケッアランスも顕著に低下す。 ることが示唆された。

【((()] 7】試驗例2

○ I −HGF − ベバリン複合体を静注したとき亞血漿 中TでA沈殿性放射活性の時間推移。

*** 」で標識したトレーサー濃度(500pM)のHG Fのみ、及びこの標品とそれぞれ20mg/ml、40 mg/ml. 80mg/mlの高け子量へついり、ある いはS()mg/mlの低分子量へいり)をそれぞれ混合 した後、窓温で50分インキュハートして作成した各複 合体を、ラットに大腿静脈より約0.25m(静注し た。次いで、大腿動脈より採血を行い、血漿中TCA- 20-M、ヘバリンで0-4mg2/m1となるように加えた。沈殿性放射濃度の推移を測定した。なお、この条件下で は、HGFの投与量は、O. 13pmol/ラット、へ パリンの投与量は、高分子量へいりとでそれぞれ、5m g/ラット、10mg/ラット、20mg/ラット、及 び低分子量へパリンで、20mg/ラットに相当する。 得られた結果を図りに示す。なお、結果として得られた 血漿中濃度を投与量で規格化して示した。図2に示され るように、高分子量へバリンでは5mg/ラット以上、 低分子へパリンでは20mg/ラットで著明な血中から のHGEとリアランスの低下がみられた。

【しし」と】試験例3

HGFによる初代培養肝細胞のレスA台成促進(HGF との接触時間の影響)

コラザナー七灌流法により調製したラット遊離肝細胞 (2. 5×10 細胞/ml) を、培養用ディッシュに 1 cm 当りの細胞数が 7×10 個になるように入れ、 Wil. ams | medium E培地(1ヵMペンスリ. 、1ヵMデ キセメサブル、5%(VグV)子ウシ血清、30mg/ | 1カナマイシュ モ (サルフェートを含む) 中で14時 間培養した。途中、培養開始と時間後に同じ培地の新鮮。40、後に高分子量へつりンを種々の投手量(0、10、2 なものに交換した。培養開始34時間後に、培地を約11 Tams' medium E培地 wln Mインスリン ln Mデキサ スサゾン: $5\%/m: アプロチニン、<math>\{0mg\}$ 1カギ マイシン。モノサルフェートを含む)に交換するととも に、HSFトルー25(f.M. を種せの時間 (v. 5 -し、時間、イトキュニートした後(細胞を洗浄、三茂茶) 異明(モ・サムを加上、合計し、日間になるまでナッチ ュベートを続けた、ドレキュベー、ヨノの途体なに時間。 後に、「こてディンとだデオキシウージンー採取農 $| oldsymbol{\psi}_{i}(0), \, oldsymbol{\psi}_{i}(0), \,$

- 最終濃度、4801M - と共に加えた。日下時間後。 1. =デオキシウンジン添加も時間後した。 - J-デ オキンカーデンの取り込み量を測定することによりいだ 八台式を評価した。そこ結果を図るに示した。なれ、結 果は、918MのHSFをとと時間接触させたときに得 すれた最大活性を190として表した。図さから明らか なように、HOFと標的細胞である肝細胞との接触時間 お長いほどいい人台成が増大していた。このことは、H GFを皿中により長時間にわたって存在させた方が、そ 10 の有効性の増強につながることを示している。

【() 0.1 6】試験例4

HGFーベバリン複合体による初代培養肝細胞のDNA 会成

HGF1nMRは12.5nMと、ヘバリン(濃度、0 - 1 (0 mg (m 1) を室温でもり分間プレインキュベ ートして、複合体を形成させた。この混合溶液20以上 を、試験例もに所した培地500m1中の培養肝細胞に 加え、2を時間インキュペートした。従って、培地中で の最終濃度としては、HGFで約40pM及び500p 途中、HGFーヘバリン混合被添加22時間後に、試験 例3と同様に「「Iーデオキシウリジンを添加し、DN A. 合成能を測定した。その結果を図4に示す。なお、図 4においては、イバリン非存在下のDNA合成能を1 b ()とし、それに対する割合(%)で表示した。図4から 明らかなように、高濃度のヘパリンとの複合体でも十分 に高い生物活性がされていた。因に、試験例2で示され た月号Fの血中クリアランス低下に十分な10mg/ラ ットというハベリンの量は、循環血漿の容積(約10m 30 1/プラット) を考慮すると、ほぼ1mg/mlに相当す

【0020】試験例5

- I-HGF静注後にヘパリンを静注したときの血漿 中TCA沈殿性放射活性の時間推移

正常ラット及び四塩化炭素処理ラット(オリーブ油で1 U倍に希釈した四塩化炭素を、ラット腹腔に1m1/1 (1) 資体重投与し、2.4時間後のラットを用いた。に、

Ⅰー標識したトレーサー量(0 13 rmol/ラ ット)のHGFを大腿静脈より静注した後11~16 オ る。る(mg/ラット)で静止したときの血漿中のTC 点一沈殿性放射活性の時間推移を測定した。なお、採血 は次腿動脈より行った。図5に、田常ラットに! 1-HIGFを静注後。16分してヘバリンを静注したときの 血漿中のTCA沈殿性放射活性の時間推移を示す。ま み、見いた、ずずき、ドーカードラーを整体動化薬 (本語舞一) 1 に 1 1 日 (主を翻す後、1190円) 1、1ン・してからりラット。 金藤田したどきの血漿する |生の心沈駒性放射活性の時間推移を示す。図を取むりに

血漿中嚢度が一遍的に出昇することが明らかである。こ の理由としては、ヘトーンにより日→Fの血中ケーマデ シアが低所すること、及び各組織表面に結合している。

1 - 月 3 F 5 P 7 パパリンにより除去され循環血中に移 行することに両原因が考えられる。ここで、重要なことは、四塩化炭素処理をして肝炎差起ラートでも出席ラリトと同様なペリーンの効果がみられている点である。 【(① 2 1】

【発明の効果】以上説明したように、HGFをハバリン 0; Mの場と混合して複合体を形成させることにより、さらに通常 10 台を示す。 用いられる各種の賦刑剤や安定化剤を添加することで、 (図3) 型 低用量で有効な持続性のあるHGF合有医薬品を得ることができる。従って、本発明によれば、投与回数及び投 射活性の関与量を低減できるので、患者の苦痛の緩和、医療費の低 (図6) 型 域などを図ることができる。 理ラットに

【図面の簡単な説明】

【図1】ラット肝臓にHGFーへハリン複合体を灌流したときの流出液中に出現した放射活性の割合(在側)及

ひ肝抽出率で右側・を示す区である。

【図1】 コー日のFーイ、 1 複合体を静止したと さら血漿中での人の取性放射が性の時間推移を分す図で まる。

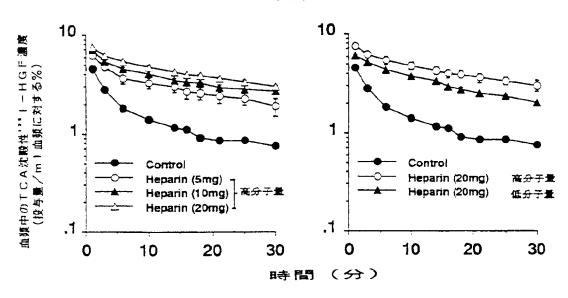
【図ぎ】H3Fによる初代培養肝細胞のDNA合成促進 におけるH3Fとの接触時間の影響を示す区である。

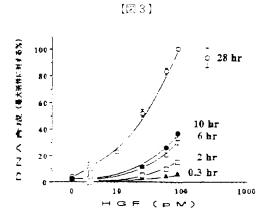
【日本】日のFーへいうシ複合体による初代培養肝細胞に $I_{\rm DNA}$ 合成を示す区である。 左側の図は日のF濃度4 $I_{\rm DNA}$ の場合を、右側の図は日のF濃度5 $I_{\rm DNA}$ の場合を示す。

【図5】正常ラットに、1-HOFを静注後、16分してヘバリンを静注したときの血漿中のTCA沈殿性放射活性の時間推移を示す図である。

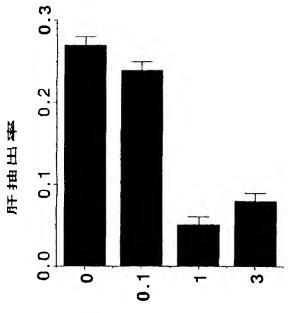
【図 6 】正常ラット(コントロール)及び四塩化炭素処理ラットに (1) H G F を静注後、(1) 1 分してヘハリン (25 m g / ラット)を静注したときの血集中のT C A 沈殿性放射活性の時間推移を示す図である。

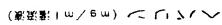
[図2]

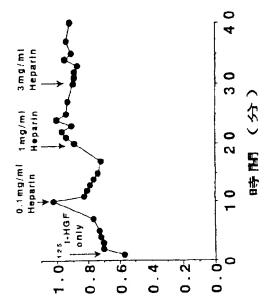




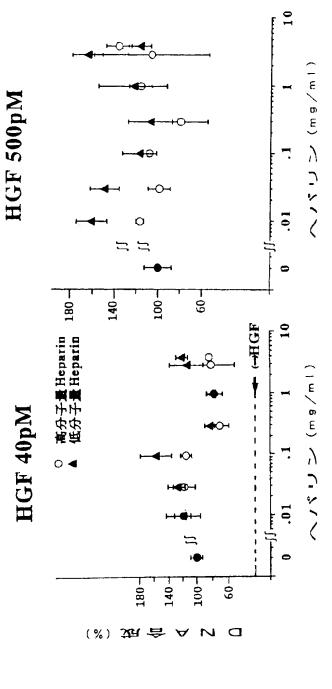


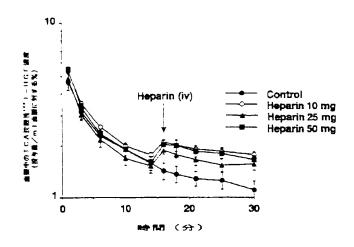




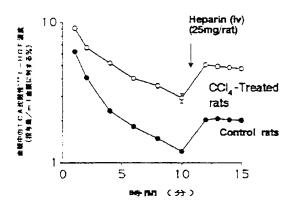


合嗜の對話検放





[图6]



フロントベージの続き

(72) 発明者 私山 雄一

東京都武蔵野市西久保3丁目4番10号

(72)発明者 花野 学

船橋市松ケ丘1丁目24番3号